

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08033493 A**

(43) Date of publication of application: **06 . 02 . 96**

(51) Int. Cl.

C12P 13/20

(21) Application number: **07121648**

(22) Date of filing: **19 . 05 . 95**

(30) Priority: **20 . 05 . 94 JP 06106928**

(71) Applicant: **NIPPON SHOKUBAI CO LTD**

(72) Inventor: **HAYASHI TAKAYA
MUKOYAMA MASAHARU
SAKANO KOICHI**

(54) PRODUCTION OF L-ASPARTIC ACID

(57) Abstract:

PURPOSE: To provide a process for producing L-aspartic acid on an industrial scale at a low cost, enabling the production of L-aspartic acid crystal having high purity in high recovery without discharging a waste liquid containing a large amount of ammonium salt.

CONSTITUTION: This process for the production of L-aspartic acid comprises the production of L-aspartic

acid from fumaric acid and ammonia or ammonium fumarate and the collection of the produced L-aspartic acid. The fumaric acid concentration is maintained to 15-25wt.% before reaction, the reaction product is incorporated with 0.85-1.2 times mol (based on the produced L-aspartic acid) of fumaric acid after the reaction to effect the crystallization of L-aspartic acid and the mother liquor is reused after collecting the L-aspartic acid at $\approx 40^{\circ}\text{C}$.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-33493

(43) 公開日 平成8年(1996)2月6日

(51) Int.Cl.⁶

C 1 2 P 13/20

識別記号

庁内整理番号

2121-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平7-121648

(22) 出願日 平成7年(1995)5月19日

(31) 優先権主張番号 特願平6-106928

(32) 優先日 平6(1994)5月20日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000004628

株式会社日本触媒

大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号

(72) 発明者 林 隆哉

茨城県つくば市観音台1丁目25番12 株式

会社日本触媒筑波研究所内

(72) 発明者 向山 正治

茨城県つくば市観音台1丁目25番12 株式

会社日本触媒筑波研究所内

(72) 発明者 阪野 公一

茨城県つくば市観音台1丁目25番12 株式

会社日本触媒筑波研究所内

(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

(54) 【発明の名称】 L-アスパラギン酸の製造方法

(57) 【要約】

【目的】 工業的に有利なL-アスパラギン酸の製造方法の提供。

【構成】 フマル酸とアンモニア及び／又はフマル酸アンモニウムからL-アスパラギン酸を生成せしめ、それを採取することによるアスパラギン酸の製造方法において、反応前のフマル酸濃度を15～25重量%とし、反応後、L-アスパラギン酸に対して0.85～1.2倍モルのフマル酸を添加してL-アスパラギン酸を晶析せしめ、40℃以上の温度でL-アスパラギン酸の結晶を採取し、母液を再利用することを特徴とする方法。

【効果】 純度の高いL-アスパラギン酸結晶を高回収率で得ることができ、しかも多量のアンモニウム塩を含有する廃液を副生しない。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フマル酸とアンモニア及び／またはフマル酸アンモニウムを含有する基質媒体にアスパルターゼ活性を有する酵素含有物を作用せしめることによりL-アスパラギン酸を生成せしめる反応をフマル酸濃度15～25重量%で行い、次に反応済み媒体中に存在しているL-アスパラギン酸に対して0.85～1.2倍モルのフマル酸を該反応済み媒体に添加することによりL-アスパラギン酸を析出させ、40℃以上の温度条件下で、析出したL-アスパラギン酸の結晶を濾過、洗浄することによってL-アスパラギン酸を採取し、次いで母液と洗液にアンモニアを添加して基質媒体として再使用することを特徴とするL-アスパラギン酸の製造方法。

【請求項2】 フマル酸及び／またはその塩が0.1～3重量%随伴しており、且つ結晶の平均サイズが50～500μmであるL-アスパラギン酸を最終製品として採取する、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、フマル酸とアンモニア又はフマル酸アンモニウムからL-アスパラギン酸を生産する際に、反応済み媒体からの母液をリサイクル使用することによって、大量の硫酸アンモニウムなど鉍酸のアンモニウム塩を含んだ廃水が排出されないように改良された方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 L-アスパラギン酸はフマル酸とアンモニア又はフマル酸アンモニウムを含有する基質媒体にアスパルターゼ活性を有する酵素含有物を接触させることによって生産されている。通常、この反応済み媒体からL-アスパラギン酸を回収するためには、硫酸などの鉍酸を用いて、反応済み媒体のpHをL-アスパラギン酸の等電点であるpH2.7程度に調節後、冷却することによってL-アスパラギン酸の結晶を析出させ、これを濾別する方法がとられている。

【0003】 この方法は安価な鉍酸を用いること、生産物であるL-アスパラギン酸の結晶としての回収率が高いこと、得られるL-アスパラギン酸の純度が高いことから工業的に用いられている有用な方法である。しかしながら、原料としてのアンモニアのロスが大きいこと、高濃度の硫酸アンモニウムなど鉍酸のアンモニウム塩を含有した廃水が大量に排出されるという問題点を有している。水溶液中のアンモニウム塩の除去は廃水処理の面でも非常に困難であり、湖沼や瀬戸内海などの内湾ではアンモニウム塩を含む窒素濃度が上昇することによる水質汚染など問題が生じてきている。

【0004】 米国特許4560653ではL-アスパラギン酸の生産の際に反応済み媒体にマレイン酸を添加して酸性にすることによってL-アスパラギン酸を晶析させ、濾液中のマレイン酸を異性化することによって反応

液のリサイクルを行う方法が提案されている。しかしながらこの方法では晶析に用いたマレイン酸を、臭素イオンを含んだ触媒を用いて、アスパルターゼが作用できるフマル酸に異性化し、異性化後、触媒を除去する工程が含まれているため、工程が煩雑になっている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 従って本発明は、工程が簡単であり、且つ多量のアンモニウム塩を排出しない、L-アスパラギン酸の製造方法を提供しようとするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らはこのような高濃度のアンモニウム塩を含有した廃水が大量に排出されない、簡易なL-アスパラギン酸の製造方法について鋭意検討を行った結果、意外にもL-アスパラギン酸の原料であるフマル酸を硫酸などの鉍酸のかわりに用いてL-アスパラギン酸の晶析を行うと、L-アスパラギン酸モノアンモニウム塩とフマル酸との間で塩の交換が起こり、L-アスパラギン酸とフマル酸モノアンモニウム塩になり、酸性下で溶解度の低いL-アスパラギン酸が結晶として分離できること、添加するフマル酸の量はL-アスパラギン酸と大体当量用いると回収率が高くなること、またフマル酸モノアンモニウム塩は低温では溶解度がそれほど大きくないが、塩の交換、結晶の分離精製の操作を加温下で行い、フマル酸モノアンモニウム塩の溶解度が大きい条件下で操作することによって、フマル酸モノアンモニウム塩のL-アスパラギン酸結晶への混入を少なくすることができることを見だし本発明を完成させるに至った。

【0007】 従って本発明はフマル酸とアンモニア及び／またはフマル酸アンモニウムを含有する基質媒体にアスパルターゼ活性を有する酵素含有物を作用せしめる反応をフマル酸濃度15～25重量%で行うことによりL-アスパラギン酸を生成せしめ、次に該反応済み媒体に含まれるL-アスパラギン酸に対して0.85～1.2倍モルのフマル酸を該反応済み媒体に添加することによりL-アスパラギン酸を析出させ、40℃以上の温度条件下で、析出したL-アスパラギン酸の結晶を濾過、洗浄することによってL-アスパラギン酸を採取し、次いで母液と洗液にアンモニアを添加して基質媒体として再使用することを特徴とするL-アスパラギン酸の製造方法を提供する。

【0008】

【発明の効果】 本発明によれば、L-アスパラギン酸の製造に際して、アンモニウム塩を含有する大量の廃水を排出せず、また反応済み媒体からの母液をリサイクルするため、結晶を分離した濾液中に溶解しているL-アスパラギン酸も次のサイクルで回収できるので、原料基質の有効利用が図られ、環境面でも経済面でも従来法より有利なL-アスパラギン酸の製造方法を提供できる。

【0009】

【具体的な説明】以下本発明の方法について実施態様を説明するが、本発明はかかる実施態様のみに限定されるものではない。本発明に用いるアスパルターゼ活性を有する酵素含有物は、例えば、高アスパルターゼ活性を有することが知られている大腸菌や *Brevibacterium* 属の微生物などの菌体、あるいは超音波、摩擦、凍結融解、酵素処理、界面活性剤処理などを施して破碎した菌体破砕物、さらに硫酸アンモニウム塩析、アセトン沈澱等常法により得られる部分精製したもの、あるいはクロマトカラム等常法で得られる精製したものであり、そのいずれでも反応に使用できる。

【0010】これらのアスパルターゼ活性含有微生物菌体、あるいはその処理物または酵素を担体に固定化して用いることもできる。固定化の担体としては、セルロース、アルギン酸、カラギーナン、マンナンゲルなどの天然系高分子、あるいはイオン交換樹脂やポリビニルアルコール、ポリアクリルアミドなどの適当な合成系高分子を常法により用いることができる。固定化することにより、アスパルターゼ、またはアスパルターゼ含有物と生産物との分離が容易になり、反応済み媒体からの母液の循環使用の操作をより容易に行うことが可能である。

【0011】また、反応に用いるアスパルターゼ活性を有する酵素含有物中に含まれるフマラーゼ活性など、該反応の妨げになりうるアスパルターゼ活性以外の酵素活性を予め失活させた後に反応に用いることも可能である。例えば、酵素含有物を、予め、L-アスパラギン酸およびアンモニウムイオン存在下、アルカリ域で40～60℃に加熱処理を行うことでフマラーゼ活性を予め失活させておくこともできる。

【0012】本発明に用いられるフマル酸あるいはフマル酸塩から選ばれるものであって、これらの混合物でもよい。また本発明に用いられるアンモニアはガス状アンモニア、アンモニア水溶液等が使用可能であるが、取扱上アンモニア水溶液が有利である。アンモニア水の濃度としては特に限定されるものではないが、工業的には10～35重量%が利用するのに好ましい。

【0013】使用されるアンモニアの量は反応に供されるフマル酸に対して1.0倍モル以上3倍モル以下が好ましい。アンモニアの量が1倍モル未満ではL-アスパラギン酸の収率が低下する結果を招いてしまい好ましくない。またアンモニア量が3倍モル以上では反応に関与する酵素又は酵素含有物の安定性が悪くなる可能性が高く好ましくない。また必要に応じて上記のアンモニア量の範囲で水酸化ナトリウムあるいは水酸化カリウムなどのアルカリ金属水酸化物を併用することもできる。なお、反応液のpHは5～10の範囲、好ましくは7.0～9.0の範囲、さらに好ましくはアスパルターゼの至適pHである8.0～9.0にするのが好ましい。

【0014】フマル酸とアンモニアを混合する場合、混

合はどのように行ってもよいが、両者の全量を一度に混合するのではなく、一方の全量に対して他方を徐々に添加するのが好ましく、特にフマル酸の懸濁液に対してアンモニアまたはアンモニア水を徐々に添加するのが好ましい。本発明の方法において基質媒体の調製に用いる反応媒体は、水性のものであれば特に限定されず、最も典型的なものは水である。さらに緩衝液、例えばリン酸緩衝液等の常用の緩衝液を用いることもできる。反応の際のフマル酸濃度は、フマル酸塩の溶解度と生産性の面から特に15～25重量%の範囲の水溶液、好ましくは15～20重量%の範囲である。

【0015】また基質媒体にはさらに塩化マンガン、硫酸マンガンなどのマンガン塩、または塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムなどのマグネシウム塩、または亜鉛塩、カルシウム塩、ニッケル塩、コバルト塩、鉄塩などの2価金属塩を0.1～50mM、好ましくは1～10mMの濃度で添加することが望ましい。本発明における反応槽の態様は特に限定されないが、例えばバッチ型反応装置、カラム型反応装置など従来から知られている反応槽で反応を行うことができる。反応槽は1つでも複数でも差し支えない。反応の際の温度は低温では反応速度が低下するため通常20℃程度を下限とし、高温下ではアスパルターゼの失活を招くため50℃程度を上限とするのが好ましく、より好ましくは25～40℃の範囲で行うのがよい。

【0016】上記のような条件でフマル酸とアンモニアを反応させた後、得られた反応済み媒体中にフマル酸を添加することにより、L-アスパラギン酸を析出させる。また、母液の循環使用の妨げにならない範囲でフマル酸塩の添加も可能である。フマル酸塩としては、フマル酸アンモニウム、フマル酸ナトリウム、フマル酸カリウムなどが使用される。前記フマル酸などを用いてL-アスパラギン酸の析出を行うことにより母液の循環使用が可能になる。析出に鉍酸を用いると鉍酸のアンモニウム塩が蓄積し、母液を循環使用するためには脱塩工程が必要になり好ましくない。ここでL-アスパラギン酸の析出のために添加されるフマル酸は固体のままでもよく、またフマル酸を水でスラリーとして添加することも可能である。

【0017】L-アスパラギン酸の析出のために反応済み媒体に添加されるフマル酸の量は、反応済み媒体中に存在しているL-アスパラギン酸とほぼ当量用いるのがよい。例えば反応済み媒体中に含まれているL-アスパラギン酸に対して0.85～1.2倍モル、好ましくは0.85～1.1倍モル添加してL-アスパラギン酸を析出させることができる。

【0018】この範囲より少ないと結晶として分離できるL-アスパラギン酸の量が少なくなり、回収率が低くなり好ましくない。またこの範囲より多いとL-アスパラギン酸の結晶にフマル酸塩が大量に混入してくるため

5

好ましくない。L-アスパラギン酸を析出せしめる際には反応済み媒体にフマル酸を徐々に添加していくほうが好ましい。この方法であれば、析出したL-アスパラギン酸の結晶は大きく、遠心濾過などによる母液からの分離が容易になり、また結晶の取り扱いも容易になる。

【0019】フマル酸を添加した反応済み媒体は0~100℃で10分間~4時間、好ましくは、20~80℃で30~120分間攪はんして塩の交換、晶析を完了させる。析出したL-アスパラギン酸の濾過方法については、吸引濾過や遠心濾過など通常の方法で行うことができるが、含液率を低くすることができる遠心濾過などの方法がより好ましい。濾過温度は40~70℃、好ましくは、40~60℃である。この範囲より高いとL-アスパラギン酸の溶解度が大きくなるためL-アスパラギン酸の回収率が低くなり、この範囲より低いとフマル酸モノアンモニウム塩の溶解度が低くなり、L-アスパラギン酸結晶にフマル酸塩が大量に混入してくるため好ましくない。

【0020】濾過した結晶は水で洗浄を行う。洗浄水の温度が低いと純度の高いL-アスパラギン酸製品を得るのに大量の洗浄水が必要となり、洗液を再利用するためには好ましくない。洗浄水の温度を40~70℃、好ましくは40~60℃にすることによって、少量の洗浄水で高純度のL-アスパラギン酸結晶を得ることができる。使用する洗浄水の量は、L-アスパラギン酸結晶の量に対して5~500重量%、好ましくは10~200重量%の範囲で用いるのがよい。

【0021】このようにして極めて簡単な方法で少量の、例えば0.1~3重量%、好ましくは0.1~1重量%のフマル酸及び/またはフマル酸塩を含有するL-アスパラギン酸の結晶を得ることができる。こうして得られるL-アスパラギン酸の結晶のサイズは晶析の方法を変えることにより所望の平均サイズにすることができるが、特に取扱やすい結晶の平均サイズとして50~500μmの範囲の結晶を得ることも可能である。このL-アスパラギン酸は工業用アスパラギン酸として極めて有用である。またこのL-アスパラギン酸はさらに精製を繰り返すことにより、食品添加物、医薬品用などに用いることも可能である。

【0022】L-アスパラギン酸の結晶を分離した母液は前記洗液と混合し、アンモニアを添加して、L-アスパラギン酸製造用の基質媒体として再使用する。必要に応じてフマル酸を添加したり、母液あるいは洗液を濃縮したりして適宜調整を行う。例えば、L-アスパラギン酸を析出させるために加えたフマル酸のモル数に対して、結晶として分離されたL-アスパラギン酸のモル数が多いと、その後のフマル酸とアンモニアの反応で得られるL-アスパラギン酸の量が少なくなっていくため、必要に応じてフマル酸を追加することによって、L-アスパラギン酸を析出せしめる前の反応済み媒体中に含ま

6

れていたL-アスパラギン酸の量に対して、それを析出せしめる際に添加したフマル酸と追加するフマル酸の合計の量が0.85倍モルから1.2倍モルになるように調整する。

【0023】また必要に応じて母液を濃縮することによって容量を初期基質媒体と同じ容積とするなど調整し、フマル酸に対するアンモニアの比が1~3倍モルになるように調節したのち、フマル酸とアンモニアのアスパルターゼ活性を有する酵素含有物との反応、フマル酸の添加によるL-アスパラギン酸の析出、L-アスパラギン酸結晶の分離、洗浄、母液の調整を繰り返すことにより、母液が基質媒体として循環使用される。本発明によれば、母液の循環は10回以上可能である。

【0024】母液へのアンモニアの添加は、例えば、次の点を考慮して行うのが、母液の循環使用を繰り返すために、また微生物菌体あるいはその破砕物のアスパルターゼ活性を長く保つためには好ましい。すなわち、循環使用される母液中に含まれるアンモニア量が該母液に含まれるフマル酸に対して1~3倍モル、好ましくは1.5~2.5倍モルになるように、アンモニアを添加する。

【0025】本発明では、フマル酸とアンモニアあるいはフマル酸アンモニウム塩を、フマル酸に対してアンモニアの量が1~3倍モルとなる量で用い、アスパルターゼ活性を有する酵素含有物と20~50℃で反応させる。この反応によりL-アスパラギン酸アンモニウムが生成するが、得られた反応済み媒体に、フマル酸を添加してL-アスパラギン酸を析出させる。析出したL-アスパラギン酸を40℃以上の温度条件下で母液から分離して、さらに洗浄することによりフマル酸及び/またはその塩を少量含んだL-アスパラギン酸を得ることができる。このL-アスパラギン酸は、工業用アスパラギン酸として極めて有用である。L-アスパラギン酸結晶を分離した母液は、L-アスパラギン酸結晶を洗浄した液とともにL-アスパラギン酸の製造用基質媒体として循環使用を繰り返すことができる。これにより、原料の効率的利用、及び、廃棄物の減少が図られる。

【0026】

【実施例】次に実施例をあげて説明するが、本発明はかかる実施例のみに限定されるものではない。

【0027】実施例1. 5Lジャーファーメンターに1L当りフマル酸20g、リン酸1カリウム1g、硫酸マグネシウム7水塩0.5g、酵母エキス20g、コーンスティーブリーカー20gを水に溶解し、pHをアンモニアで6.8に調節した培地3Lを仕込み滅菌したのち、別に500ml振とうフラスコに同上の培地50mlを入れて培養しておいたエッシャーヒア・コリ(Escherichia coli) (ATCC 11303)を接種し、37℃で通気攪拌培養した。培地中のフマル酸が消失した時点で、菌体培養液に酢酸を加え、pHを約5にして45℃、1時間放置後、培

7

養液を遠心分離にかけ、菌体を分離した。この菌体を30等分し、-80℃で凍結して冷蔵した。

【0028】フマル酸100g、硫酸マグネシウム7水塩0.125gを水300mlに加えた後、25%アンモニア水で中和してpHを8.3に調節後、水を追加して0.5Lの基質媒体とした。この基質媒体に先に30等分した凍結菌体の一つをいれ、37℃で穏やかに振とうしながら5時間反応させた。反応済み媒体の分析の結果、初期仕込みフマル酸に対して99.0モル%のL-アスパラギン酸アンモニウムが生成していた。

【0029】この反応済み媒体を遠心分離して菌体を除いた後、フマル酸110gを添加し、60℃に加熱して30分保った後50℃まで冷却した。冷却後、吸引濾過器で濾過し、母液約370mlを得た。一方、濾別したL-アスパラギン酸を含む結晶約200gを約500mlの50℃の温水で洗浄し、乾燥した。得られた結晶の重量、純度を調べたところ、重量105g、純度96.2重量%（水分除く）（フマル酸3.0重量%）（結晶平均サイズ250μm）であった。

【0030】ついで、先の母液と洗液をあわせて、減圧下で濃縮し、25%アンモニア水を加えてpHを8.3に調節し、水を加えて0.5Lの基質媒体とした。この基質媒体に先と同様に凍結菌体の一つをいれ37℃で5時間反応させた。先と同様に遠心分離して菌体を除いた後、フマル酸110gを添加して加熱、冷却を行った。析出したL-アスパラギン酸を吸引濾過し、約0.5Lの50℃の温水で2回結晶を洗浄し、十分に水分をきった後、乾燥した。得られた結晶の重量は114.5g、純度は99.0重量%（水分除く）（フマル酸0.73重量%）（結晶平均サイズ150μm）であった。

【0031】以下、上記の2回目の操作を繰り返し、フマル酸とアンモニアの反応を合計10回行った（母液の循環使用回数は9回）。10回の操作により、得られたL-アスパラギン酸は、9回目の操作において晶析のために添加されたフマル酸に対して収率99.1モル%、純度99.1重量%（水分除く）（フマル酸0.61重量%）（結晶平均サイズ100μm）であった。10回目の繰り返し操作により得られた結晶に50℃の温水300mlを加えてよく混合した後、再度吸引濾過し、十分に水分をきり、乾燥する操作を繰り返し3回行ったところ、結晶の純度は99.5重量%（水分除く）（フマル酸0.15重量%）（結晶平均サイズ90μm）になった。

【0032】実施例2. 実施例1と同様にして、0.5Lの基質媒体に凍結菌体の一つをいれ反応を行った。反応済み媒体を分析したところ、仕込フマル酸に対して99.1モル%のL-アスパラギン酸が生成していた。この反応済み媒体を遠心分離して菌体を除いた後、フマル酸85gを添加し、60℃に加熱して30分保った後50℃まで冷却した。冷却後、吸引濾過器で吸引濾過し、

8

母液約370mlを得た。一方、濾別したL-アスパラギン酸を含む結晶を約0.5Lの50℃の温水で洗浄、乾燥したところ、得られた結晶の重量は106g、純度は92.7重量%（水分除く）（フマル酸6.1重量%）（結晶平均サイズ200μm）であった。

【0033】ついで、先の母液と洗液をあわせて、減圧下で濃縮し、フマル酸15gと25%アンモニア水を加えてpHを8.3に調節し、水を加えて0.5Lの基質媒体とした。この基質媒体に先と同様に、凍結菌体の一つを加えて37℃で5時間反応させた。先と同様に遠心分離して菌体を除いた後、フマル酸85gを添加して加熱、冷却を行った。析出したL-アスパラギン酸を吸引濾過し、約0.5Lの50℃の温水で2回結晶を洗浄し、十分に水分をきった後、乾燥した。得られた結晶の重量は113.5g、純度は99.0重量%（水分除く）（フマル酸0.73重量%）（結晶平均サイズ150μm）であった。

【0034】比較例1. 実施例1と同様にして、0.5Lの基質媒体に凍結菌体の一つをいれ反応を行った。反応済み媒体を分析したところ、仕込フマル酸に対して99.0モル%のL-アスパラギン酸が生成していた。この反応済み媒体を遠心分離して菌体を除いた後、フマル酸50gを添加し、60℃に加熱して30分保った後50℃まで冷却した。冷却後、吸引濾過器で吸引濾過し、母液約400mlを得た。一方、濾別したL-アスパラギン酸を含む結晶を約0.5Lの50℃の温水で洗浄、乾燥したところ、得られた結晶の重量は80.7g、純度は98.4重量%（水分除く）（フマル酸1.2重量%）（結晶平均サイズ200μm）であった。

【0035】比較例2. 実施例1と同様にして、0.5Lの基質媒体に凍結菌体の一つをいれ反応を行った。反応済み媒体を分析したところ、仕込フマル酸に対して99.0モル%のL-アスパラギン酸が生成していた。この反応済み媒体を遠心分離して菌体を除いた後、フマル酸85gを添加し、30℃で30分攪拌後、吸引濾過器で吸引濾過し、母液約350mlを得た。一方、濾別したL-アスパラギン酸を含む結晶に約0.5Lの30℃の水を加えてよく混合したのちに吸引濾過を行い、乾燥したところ、得られた結晶の重量は153.0g、純度は60.3重量%（水分除く）（フマル酸33.2重量%）（結晶平均サイズ200μm）であった。

【0036】実施例3. フマル酸75g及び硫酸マグネシウム7水塩0.125gを水300mlに加えた後、25%アンモニア水で中和してpHを8.3に調節後、水を追加して0.5Lの基質媒体とした。この基質媒体に先に30等分した凍結菌体の一つをいれ、37℃で穏やかに振とうしながら5時間反応させた。反応済み媒体を分析したところ、仕込フマル酸に対して99.1モル%のL-アスパラギン酸が生成していた。

【0037】この反応済み媒体を遠心分離して菌体を除

いた後、フマル酸67.5gを添加し、60℃に加熱して30分保った後50℃まで冷却した。冷却後、吸引濾過器で吸引濾過し、母液約410mlを得た。一方、濾別したL-アスパラギン酸を含む結晶を約0.5Lの50℃の温水で洗浄、乾燥したところ、得られた結晶の重量は67.1g、純度は96.8重量%（水分除く）（フマル酸3.1重量%）（結晶平均サイズ200μm）であった。

【0038】ついで、先の母液と洗液をあわせて、減圧下で濃縮し、フマル酸7.5gと25%アンモニア水を加えてpHを8.3に調節し、水を加えて0.5Lの基質媒体とした。この基質媒体に先と同様に、凍結菌体の一つを加えて37℃で5時間反応させた。先と同様に遠心分離して菌体を除いた後、フマル酸67.5gを添加して加熱、冷却を行った。析出したL-アスパラギン酸を吸引濾過し、約0.5Lの50℃の温水で2回結晶を洗浄し、充分に水分をきった後、乾燥した。得られた結晶の重量は75.9g、純度は99.0重量%（水分除く）

*く）（フマル酸0.73重量%）（結晶平均サイズ150μm）であった。

【0039】比較例3. 実施例3と同様にして、0.5Lの基質媒体に凍結菌体の一つをいれ反応を行った。反応済み媒体を分析したところ、仕込フマル酸に対して99.0モル%のL-アスパラギン酸が生成していた。この反応済み媒体を遠心分離して菌体を除いた後、フマル酸52.5gを添加し、60℃に加熱して30分保った後50℃まで冷却した。冷却後、吸引濾過器で吸引濾過し、母液約450mlを得た。一方、濾別したL-アスパラギン酸を含む結晶を約0.5Lの50℃の温水で洗浄、乾燥したところ、得られた結晶の重量は46.2g、純度は98.1重量%（水分除く）（フマル酸1.6重量%）（結晶平均サイズ200μm）であった。以上の実施例、比較例の結果を以下の表にまとめた。

【0040】

【表1】

	初期フマル酸 濃度	添加フマル酸 (モル比)	回収率 (%)	純度 (%)	温度*
実施例1	20	1.10	89.0	96.2	50
実施例2	20	0.85	86.5	92.7	50
比較例1	20	0.50	70.0	98.4	50
比較例2	20	0.85	81.3	60.3	30
実施例3	15	0.90	76.2	96.8	50
比較例3	15	0.70	53.2	98.1	50

温度* = 精製操作（濾過、洗浄）の温度

表に示されるとおり、添加するフマル酸のモル比が小さいと、結晶として分離できるL-アスパラギン酸の回収率が低くなったが、モル比が大きいと回収率が高くなつた。50℃で精製操作を行った場合には、いずれの条件においても純度90重量%以上の値が得られた。